

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/039976 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 15/15, 15/19, 15/21,
5/10, 9/10, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/574

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013957

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 30 日 (30.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-315451
2002 年 10 月 30 日 (30.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND

TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区
霞が関 1-3-1 Tokyo (JP). 富士レバイオ株式会社 (FU-
JIREBIO INC.) [JP/JP]; 〒103-0007 東京都中央区日
本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 Tokyo (JP).

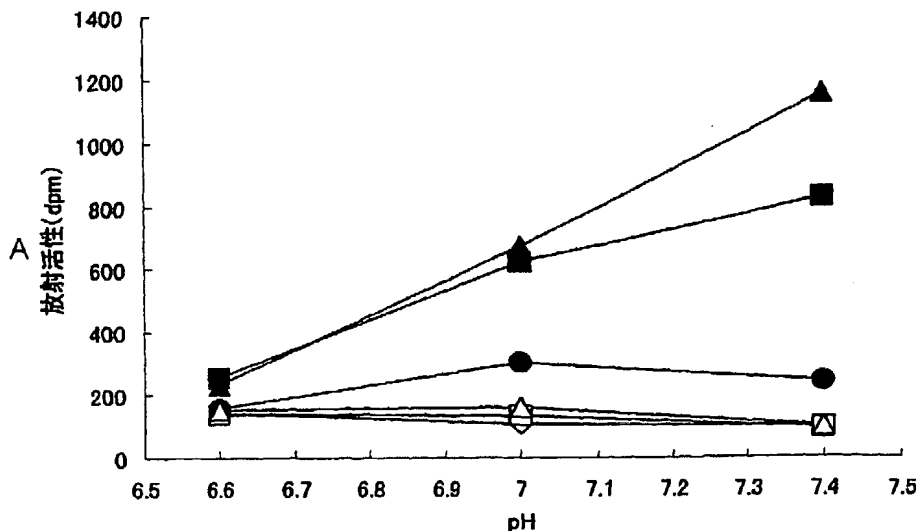
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 成松 久 (NARI-
MATSU, Hisashi) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市
梅園 1-1-1 つくば中央第二 独立行政法人産業技術
総合研究所内 Ibaraki (JP). 比留間 徹 (HIRUMA, Toru)
[JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つ
くば中央第二 独立行政法人産業技術総合研究所内
Ibaraki (JP). 榑谷内 晶 (TOGAYACHI, Akira) [JP/JP]; 〒
305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央
第二 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
西原 祥子 (NISHIHARA, Shoko) [JP/JP]; 〒192-8577 東
京都八王子市丹木町 1-2 3 6 創価大学 生命科学
研究所内 Tokyo (JP).

/続葉有/

(54) Title: NOVEL GLYCOSYLTRANSFERASE, NUCLEIC ACID ENCODING THE SAME AND METHOD OF DETECTING
CANCER TISSUE USING THE NCULEIC ACID

(54) 発明の名称: 糖転移酵素及びそれをコードする核酸、並びに該核酸を用いた癌組織の検出方法



A...RADIOACTIVITY (dpm)

(57) Abstract: It is intended to provide a novel glycosyltransferase, a nucleic acid encoding the same and a novel method of ex-
amining canceration of a tissue. The novel glycosyltransferase is 1,3-N-acetyl-D-glucosamine glycosyltransferase characterized
by containing a polypeptide which has an amino acid sequence consisting of the 56- to 402-amino acids in SEQ ID NO:2 or an
amino acid sequence derived from the above-described amino acid sequence by substitution, deletion or insertion of one or several
amino acids and having an activity of transferring an N-acetyl-D-glucosamine group from an N-acetyl-D-glucosamine donor to an
N-acetyl-D-glucosamine recipient.

/続葉有/

WO 2004/039976 A1



(74) 代理人: 社本 一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号新大手町ビル206区ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 新規な糖転移酵素及びそれをコードする核酸、並びに組織の癌化の新規な検定方法を提供する。本発明の新規な糖転移酵素は、1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素であって、配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は挿入したアミノ酸配列を有し、且つN-アセチル-D-グルコサミン受容体基質に、N-アセチル-D-グルコサミン供与体基質からN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する活性を有するポリペプチド、を含むことを特徴とする。

明細書

糖転移酵素及びそれをコードする核酸、並びに該核酸を用いた
癌組織の検出方法

5 技術分野

本発明は新規な「糖転移酵素」及びそれをコードする「核酸」に関連し、また癌化した組織における前記核酸の発現量が増加することに基づく「組織の癌化検出方法」に関する。

10 背景技術

近年、生体内での糖鎖や複合糖質の働きが注目されている。例えば、血液型を決定する因子は糖タンパク質であり、また神経系の働きに関与しているのは糖脂質である。従って、糖鎖を合成する働きのある酵素は、様々な糖鎖がもたらす生理活性を解析する上で極めて重要な手がかりとなる。

- 15 糖の中でN-アセチル-D-グルコサミン残基 (GlcNAc) はグリコサミノグリカンの構成成分であると共に、スフィンゴ糖脂質、ムチン型糖鎖と様々な糖鎖構造に存在する糖残基である。従って、GlcNAcを転移する酵素は、生体内の様々な組織で働く糖鎖の働きを解析する上で極めて重要なツールとなる。

- 20 これまで、GlcNAcを転移する活性を有するN-アセチルグルコサミン酵素は、少なくとも19種類知られており (表1)、各々、受容体基質特異性が異なる。

表 1 N-アセチルグルコサミン転移酵素とその基質特異性

| 正式名称 | 略称 | 結合形式 | 基質特異性 | 文献 |
|---|---------------|--------------|---|----------|
| 1 N-acetylglucosaminyltransferase-I | GnT-I | β 1-2 | Man α 1-3(Man α 1-6)Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4 GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn | 非特許文献 1 |
| 2 N-acetylglucosaminyltransferase-II | GnT-II | β 1-2 | Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4 GlcNAc β 1-Asn | 非特許文献 2 |
| 3 N-acetylglucosaminyltransferase-III | GnT-III | β 1-4 | GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4 GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn | 非特許文献 3 |
| 4 N-acetylglucosaminyltransferase-IV | GnT-IV | β 1-4 | GlcNAc β 1-2(GlcNAc β 1-6)Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn | 非特許文献 4 |
| 5 N-acetylglucosaminyltransferase-V | GnT-V | β 1-6 | GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2(GlcNAc β 1-4)Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn | 非特許文献 5 |
| 6 N-acetylglucosaminyltransferase-VI | GnT-VI | β 1-4 | GlcNAc β 1-2(GlcNAc β 1-6)Man α 1-6(GlcNAc β 1-2(GlcNAc β 1-4) Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn | 非特許文献 6 |
| 7 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase | iGnT | β 1-3 | Gal β 1-4GlcNAc β 1-R | 非特許文献 7 |
| 8 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-3 | β 3GnT3 | β 1-3 | Gal β 1-3GalNAc-O-ST | 非特許文献 8 |
| 9 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-4 | β 3GnT4 | β 1-3 | Gal β 1-4(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4)n-R | 非特許文献 9 |
| 10 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-5 | β 3GnT5 | β 1-3 | Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4-Cer | 非特許文献 10 |
| 11 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-6 | β 3GnT6 | β 1-3 | GalNAc-O-ST | 非特許文献 11 |
| 12 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-7 | β 3GnT7 | β 1-3 | Gal β 1-4(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4)n-Cer | 非特許文献 12 |
| 13 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase | Fringe | β 1-3 | C2-X-X-G-G-(Fuc-O)ST-C3 | 非特許文献 13 |
| 14 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase | iGnT | β 1-6 | GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R | 非特許文献 14 |
| 15 Core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-I | C2GnT-I | β 1-6 | Gal β 1-3GalNAc-O-ST | 非特許文献 15 |
| 16 Core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-II | C2GnT-II | β 1-6 | Gal β 1-3GalNAc-O-ST | 非特許文献 16 |
| 17 Core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-III | C2GnT-III | β 1-6 | Gal β 1-3GalNAc-O-ST | 非特許文献 17 |
| 18 α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase | α 4GnT | α 1-4 | Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-R | 非特許文献 18 |
| 19 peptide β -N-acetylglucosaminyltransferase | OGT | O- | Y-S-D-S-P-S-T-S-T | 非特許文献 19 |

アンダーラインの糖またはアミノ酸に対して N-acetylglucosamine を転移する。

発明の開示

生体内での糖鎖の働きが注目されているが、生体内での糖鎖合成の解析は十分

に進んでいるとは言えない。糖鎖合成のメカニズム、生体内での糖合成の局在が十分に解析されていないことも一因である。糖鎖合成のメカニズムを解析するに当たっては、糖鎖合成酵素、特に糖転移酵素を解析し、その酵素を使ってどのような糖鎖が生成されるのかを分析する必要である。そのために新たな糖転移酵素を見つ
5 つけだし、その機能を解析することに対する要請が高まっている。

従って、本発明は、N-アセチル-D-グルコサミン受容体基質にN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する活性を有する新規な β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質、及びそれをコードする核酸を提供することを目的とする。また、本発明、該核酸を宿主細胞内で発現する形質転換
10 体、さらに、当該形質転換体を生育させて、当該タンパク質を単離する方法を提供することを目的とする。さらにまた、本発明は、該核酸または該糖転移酵素タンパク質の発現を示標に、生物試料の癌化を検定する方法を提供する。

図面の簡単な説明

15 図1は、本発明タンパク質の活性への反応pH、各種二価金属イオン、及びEDTAの影響を示す図である。黒塗りの三角はマンガンイオン、黒塗りの丸はコバルトイオン、黒塗りの正方形はマグネシウムイオンを各々示し、白抜きの三角はEDTA、白抜きの丸と菱形は陰性対照を各々示す。縦軸は放射能の量(dpm)を示し、横軸は反応pHを示す。

20

発明の詳細な説明

本発明者等は、目的とする酵素と類似した作用を有する酵素遺伝子の塩基配列を基に、配列同一性が高いと思われる目的とする酵素を単離及び精製を試みた。具体的には、まず、公知の糖転移酵素である β 3グルクロン酸転移酵素7(β 3
25 GnT7)の塩基配列をクエリーとしてBLAST検索を行い、その結果、相同性を有する配列としてEST配列(GenBank Accession No. BC004908)を見出した。さらに、PCRでタンパク質の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列及び推定アミノ酸を決定した。これにより、当該核酸がコードするタンパク質が新規な糖転移酵素であることを見い出した。また、更に癌化した組織において、前記核酸

の発現量が健常組織における発現量よりも高まっていることを発見し、これを組織の癌化検出方法に応用することで本発明を完成した。

本発明は、N-アセチルグルコサミンを転移する活性を有するタンパク質及びこれらをコードする核酸を提供することにより、当該技術分野におけるこれらの多様な必要性を満たすのに貢献する。

すなわち本発明は以下の通りである。

(1) 下記の性質を有する β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質。

活性: N-アセチル-D-グルコサミン供与体基質からN-アセチル-D-グルコサミン受容体基質にN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する。

基質特異性: (1) GalNAc、(2) GlcNAc、(3) Gal、(4) Xyl、(5) Fuc、(6) Man、(7) ManNAc、(8) Gal β 1-4Glc、及び(9) Gal β 1-4GlcNAcの何れかのN-アセチル-D-グルコサミン受容体基質に、N-アセチル-D-グルコサミン供与体基質からN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する。

ここで「GalNAc」とはN-アセチル-D-ガラクトサミン残基を示し、「GlcNAc」とはN-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「Gal」とはD-ガラクトース残基を示し、「Xyl」とはD-キシロース残基を示し、「Fuc」とはD-フコース残基を示し、「Man」とはD-マンノース残基を示し、「ManNAc」とはN-アセチル-D-マンノース残基を示し、「-」はグリコシド結合を示す。式中の数字は前記グリコシド結合が存在する糖の炭素番号を示す。「 β 」は糖環1位の前記グリコシド結合のアノマーを示し、5位CH₂OH又はCH₃との位置関係がシスのものを「 β 」で示す。

金属イオン要求性: 二価金属陽イオンを酵素反応に必要とする。

反応pH: 中性近辺である。

(2) 以下の(A)又は(B)のポリペプチドを含む β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質。

(A) 配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド;

(B) 配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列にお

いて、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、又は挿入したアミノ酸配列を有し、且つN-アセチル-D-グルコサミン受容体基質に、N-アセチル-D-グルコサミン供与体基質からN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する活性を有するポリペプチド。

- 5 (3) (2) (A) のポリペプチドが、配列番号 2 記載のアミノ酸番号 56 乃至 402 からなるアミノ酸配列からなる、(2) 記載の糖転移酵素タンパク質。
- (4) (2) (A) のポリペプチドが、配列番号 2 記載のアミノ酸番号 1 乃至 402 からなるアミノ酸配列からなる、(2) 記載の糖転移酵素タンパク質。
- (5) 糖転移酵素タンパク質が、配列番号 2 のアミノ酸番号 56 乃至 402 からなるアミノ酸配列と少なくとも 50% 同一のアミノ酸配列を有する、(2) ないし (4) のいずれか記載の糖転移酵素タンパク質。
- 10 (6) (2) 乃至 (5) 何れか記載のタンパク質をコードする塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸。
- (7) 配列番号 1 記載の塩基番号 166 乃至 1206 からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる、(6) に記載の核酸。
- 15 (8) 配列番号 1 記載の塩基番号 1 乃至 1206 からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる、(6) に記載の核酸。
- (9) DNAであることを特徴とする (6) 乃至 (8) 何れか記載の核酸。
- (10) (6) 乃至 (9) 何れか記載の核酸、又は当該核酸の塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸にストリンジントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする測定用核酸。
- 20 (11) 配列番号 1 記載の塩基番号 683 乃至 775 からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列を含む、(10) に記載の測定用核酸。
- (12) 測定用核酸が、プローブ、プライマーとして使用される、(10) 又は (11) 記載の測定用核酸。
- 25 (13) 測定用核酸が、癌マーカーとして使用される、(10) 乃至 (12) 何れか記載の測定用核酸。
- (14) DNAであることを特徴とする (10) 乃至 (13) 何れか記載の測定用核酸。

- (15) (6) 乃至 (14) 何れか記載の核酸を含むベクター。
- (16) (15) 記載のベクターを含む形質転換体。
- (17) (15) 記載の形質転換体を生育させ、 β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を発現させ、その生育物から前記糖転移酵素を回収する、ことを含む、前記糖転移酵素タンパク質の製造方法。
- 5 (18) (1) 乃至 (5) 何れか記載の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を認識する抗体。
- (19) 生物試料の癌化を検定する方法であって、
- (a) 生物試料中の (1) ないし (5) の何れか記載の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を定量し；そして
- 10 (b) 生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値の 1.5 倍以上である場合には癌化していると判断する工程を含む、前記方法。
- 15 (20) (18) 記載の抗体を用いて β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を定量する、(19) 記載の検定方法。
- (21) 生物試料の癌化を検定する方法であって、
- (a) 生物試料中の (6) 記載の核酸を定量し；そして
- (b) 生物試料中の (6) 記載の核酸の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記核酸の定量値の 1.5 倍以上である場合には癌化していると判断する
- 20 工程を含む、前記方法。
- (22) (a-1) 生物試料中の (6) 記載の核酸に (10) 記載の測定用核酸から選択される一対のプライマーをハイブリダイズさせ；
- (a-2) (6) 記載の核酸を増幅させ；
- 25 (a-3) 前記増幅産物を定量し；そして
- (b) 前記定量値が、対照の正常な生物試料中の対応する定量値の 1.5 倍以上である場合には癌化していると判断する工程を含む、(21) 記載の方法。
- (23) 配列番号 1 記載の塩基番号 683-775 からなる塩基配列又はそれ

に相補的な塩基配列を含む核酸を定量する、(21)又は(22)に記載の方法。

(24) 前記生物試料が、大腸由来の試料である、(21)乃至(23)何れか記載の方法。

5 発明を実施するための形態

以下、本発明を発明の実施の形態により詳説する。

(1) 本発明タンパク質

本発明タンパク質はGlcNAc受容体基質に、GlcNAc供与体基質からGlcNAc残基を転移する活性を有する糖転移酵素である。

- 10 ここで「GlcNAc供与体基質」とは、GlcNAcを有する糖ヌクレオチドであることが好ましい。そのような物質としては、例えば、アデノシン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (ADP-GlcNAc)、ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc)、グアノシン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (GDP-GlcNAc)、シチジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (CDP-GlcNAc) 等が例示され、UDP-GlcNAcが最も好ましいが特に限定はされない。

- 15 「GlcNAc受容体基質」は本発明タンパク質がGlcNAc供与体基質からGlcNAcを転移することができる化合物である限り特に限定はされないが、(1) GalNAc、(2) GlcNAc、(3) Gal、(4) Xyl、(5) Fuc、(6) Man、(7) ManNAc、(8) Gal β 1-4Glc、及び(9) Gal β 1-4GlcNAcの何れかであることが好ましい。さらに、上記糖残基の糖環1位に α 又は β 結合で、これに限定されるわけではないが、Bz、pNp、oNpの何れかが結合していることがより好ましい。最も好ましいGlcNAc受容体基質は、GalNAc α 1-Bz、GalNAc β 1-pNp、GlcNAc α 1-Bz、GlcNAc β 1-Bz、Gal α 1-pNp、Gal β 1-oNp、Xyl β 1-pNp、Fuc α 1-pNp、Man α 1-Bz、ManNAc α 1-Bz、Gal β 1-4Glc β 1-Bz、Gal β 1-4GlcNAc α 1-pNpの何れかである。ここで、「Bz」は
25 ベンジル基を示し、「pNp」はパラニトロフェニル基を示し、「oNp」はオルトニトロフェニル基を示す。また、「-」はグリコシド結合を示し、式中の数字は前記グリコシド結合が存在する糖環の炭素番号を示す。「 α 」及び「 β 」は糖環1位の前記グリコシド結合のアノマーを示し、5位CH₂OH又はCH₃との位置関係がトランスのものを「 α 」、シスのものを「 β 」で示す。

これらの「GlcNAc受容体基質」の何れかの化合物へ「GlcNAc残基」を転移する活性の確認は、例えば $[^{14}\text{C}]$ 又は $[^3\text{H}]$ などの放射性同位元素でGlcNAc残基を放射能標識した「GlcNAc供与体基質」と、上記「GlcNAc受容体基質」で例示した各化合物とを混合し、そこに「本発明タンパク質」の存在下で酵素反応させ、「反応生成物」を「GlcNAc供与体基質」と分離して「反応生成物の放射能」を測定する方法で行うことができる。このような方法としては具体的には後述の実施例2記載の方法が例示される。

「本発明タンパク質」は酵素反応に「二価金属陽イオン」を必要とする（この性質を「金属イオン要求性」とも記載する）。すなわち、「二価金属陽イオン」をキレート剤（例えばエチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」とも略記する）等）でキレートすると、活性を実質的に失う性質を有する。

「二価金属陽イオン」としては、例えばカルシウムイオン (Ca^{2+})、コバルトイオン (Co^{2+})、マンガンイオン (Mn^{2+})、マグネシウムイオン (Mg^{2+}) 等が挙げられる。好ましくは、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} が2.5mMから40mMの濃度で共存する条件下では酵素活性の増強が確認される。 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} が特に好ましい。

「本発明タンパク質の反応pH」は中性近辺、好ましくは、pH6.0からpH8.0である。例えば、20mMの Mn^{2+} 共存下で、pH7.4での酵素活性の方がpH6.6での酵素活性よりも強い（何れもカコジル酸ナトリウム緩衝液中）という特徴を有する。このような酵素活性の強さの比較は、例えば実施例2記載の方法により、放射能標識を用いて容易且つ正確に行うことができる。

このような「本発明タンパク質」は、より具体的には、例えば、以下の(A)乃至(A'')のポリペプチドを含む。

- (A) 配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド
- (A') 配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- (A'') 配列番号2記載のアミノ酸番号1乃至402からなるアミノ酸配列からなるポリペプチド

また、それらに糖鎖が結合した糖ポリペプチドの形態の糖転移酵素も本発明タ

ンパク質の一態様として挙げられる。

なお、一般にアミノ酸配列に 1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、又は挿入等の変異が存在していても、酵素の活性が維持されることは当業者にとっては理解されうるところであり、上記配列番号 2 記載のアミノ酸番号 56 乃至 402 からなるアミノ酸配列からなるポリペプチド又は配列番号 2 記載のアミノ酸番号 1 乃至 402 からなるアミノ酸配列からなるポリペプチドの当該アミノ酸配列に於いても 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、又は挿入等の変異が存在していても「糖転移酵素活性」を有する限りにおいて上記「ポリペプチド」として使用することができる。

- 10 すなわち、天然に存在するポリペプチドには、それをコードする DNA の多型や変異の他、生成後のポリペプチドの細胞内及び精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、又は挿入等の変異が起こりうるが、それにも拘わらず変異を有しないポリペプチドと実質的に同等の生理、生物学的活性を示す物があることが知られている。このように構造的に若干の相違があってもその機能については大きな違いが認められないものも、上記「ポリペプチド」
15 に包含される。人為的にポリペプチドのアミノ酸配列に上記の様な変異を導入した場合も同様であり、この場合には更に多種多様の「変異を有するポリペプチド」を作成することが可能である。なお、このような置換、欠失、又は挿入等の変異には、「転位」、核酸中の一部分の別位置への移動、例えば、染色体上の遺伝子
20 移動も含む。

- 例えば、ヒトインターロイキン 2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリン残基に置換したポリペプチドが IL-2 の活性を保持することが知られている (Science, 224 (1984), p. 1431)。またある種のポリペプチドは、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に
25 分泌されるポリペプチドに存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれに当たり、これらの領域のほとんどは翻訳後、又は活性型ポリペプチドへの転換に際して除去される。このような活性に必須でないペプチド領域の配列を有するポリペプチドは、二次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するポリペプチドであり、「本発明タン

パク質のポリペプチド」もそのような配列が連結していても良い。このような「変異を有するポリペプチド」は「部位特異的変異法」などの公知の方法により容易に作成することが可能である。

5 なお、ここで「複数個」とは、GlcNAc供与体基質からGlcNAc受容体基質にGlcNAc残基を転移する糖転移活性を有する限りに於いて「複数個」とは特に限定はされないが、好ましくは全アミノ酸数の10%以下、より好ましくは5%以下程度のアミノ酸数を示す。例えば347個のアミノ酸からなるポリペプチド（例えば上述の（A'）記載のポリペプチド）に於いては35個以下、好ましくは17個以下を示し、また
10 402個のアミノ酸からなるポリペプチド（例えば上述の（A''）記載のポリペプチド）に於いては40個以下、好ましくは20個以下を示す。

本発明の糖転移酵素タンパク質は、クローニングされた核酸の塩基配列からの推定に基づいて、配列番号2のアミノ酸配列を有するが、その配列を有するタンパク質のみに限定されるわけではなく、本明細書中に記載した特性を有する限り全ての相同タンパク質を含むことが意図される。

15 本発明タンパク質について、BLASTによる同一性検索を行うと、最も似ているβ3GnT7とは46%の同一性である。従って、本発明タンパク質は新規な酵素であると考えられる。よって、同一性は、少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらになお好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上である。

20 本願明細書において、同一性のパーセントは、例えば、Altschulら（Nuc. Acids Res., 25, p.3389-3402, 1997）に記載されているBLASTプログラム、あるいはPearsonら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, p.2444-2448, 1998）に記載されているFASTAを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI)
25 、あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ)のウェブサイトから利用することが可能である。各プログラムによる同一性検索の各種条件（パラメーター）は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。なお、当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、使用可能である。

一般的に、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換（例えば、ある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性アミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換）を導入した場合、得られる変異タンパク質はもとのタンパク質と同様の性質を有することが多い。遺伝子組換え技術を使用して、このような所望の変異を有する組換えタンパク質を作成する手法は当業者に周知であり、このような変異タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

本発明のタンパク質は、例えば、後述する実施例 1 に従って、本発明の核酸による配列番号 1 に記載の核酸を適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、昆虫、又は動物細胞に、それぞれの宿主で増幅可能な発現ベクターを用いて導入し、発現させることにより、当該タンパク質を大量に得ることができる。

本発明によって、このタンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードする DNA 配列が開示されれば、当該配列又はその一部を利用して、ハイブリダイゼーション、PCR 等の核酸増幅反応等の遺伝子工学的手法を用いて、他の生物種から同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を容易に単離することができる。このような場合、それらの遺伝子がコードする新規タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

なお、本発明タンパク質は、そのアミノ酸配列が上述した通りのものであり、前記酵素活性を有するものであれば、タンパク質に糖鎖が結合していてもよい。

より具体的には、後述する実施例 2 に記載したように、本発明タンパク質における受容体基質の探索から、該タンパク質は、N-アセチル-D-グルコサミンに N-アセチル-D-グルコサミンを転移する活性を有するものである。特に、配列相同性より、 β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移活性を有すると考えられる。

(2) 本発明核酸

本発明はまた、本発明の新規糖転位酵素タンパク質の全長または断片をコードする核酸を提供する。

「本発明核酸」としては、例えば配列番号 1 に記載の塩基番号 683 乃至 775

からなる塩基配列からなる核酸又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸（本発明核酸1）、配列番号1記載の塩基番号166乃至1206（配列番号2のアミノ酸残基56-402をコードする）からなる塩基配列からなる核酸（本発明核酸2）、配列番号1記載の塩基番号1乃至1206（配列番号2のアミノ酸残基1-402をコードする）からなる塩基配列からなる核酸（本発明核酸3）又はそれらに相補的な塩基配列からなる核酸が例示される。これらの核酸がコードするアミノ酸配列と縮重により同一のアミノ酸配列をコードする核酸も本発明に含まれる。

上記「本発明核酸1」は、例えば後述の「本発明検出法」への利用に適した核酸である。

上記「本発明核酸2」は、「本発明タンパク質のポリペプチド」のうち、「膜貫通領域（疎水性アミノ酸が10乃至20個程度連続した領域）を欠失した態様のポリペプチド」をコードするので、当該核酸を発現させることによって生成されるポリペプチドを「可溶性ポリペプチド」とすることができる。また「本発明核酸3」は、「本発明タンパク質のポリペプチド」の全配列をコードする。特に「本発明核酸2」や「本発明核酸3」等は、タンパク質合成における終始コドンに相当する塩基配列を含むため、「配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列からなるポリペプチド」（上記（A'）記載のポリペプチド）や「アミノ酸番号1乃至402からなるアミノ酸配列からなるポリペプチド」（上記（A''）記載のポリペプチド）を遺伝子工学的に調製するためにも使用することができる。

「本発明核酸」は、一本鎖及び二本鎖型両方のDNA、及びそのRNA相補体も含む。DNAには、例えば、天然由来のDNA、組換えDNA、化学結合したDNA、PCRによって増幅されたDNA、及びそれらの組み合わせが含まれる。後述の「癌化検出方法」にプローブ等として使用する場合や、ベクターや形質転換体の調製時に安定である点で優れるため、DNAであることが好ましい。

特に配列番号1記載の塩基配列の全部又は一部を有する核酸は、例えば「本発明核酸」の生体内での発現状況などを検査するための、プライマー、プローブ等として使用することができ、医学研究用の試薬又は診断薬として極めて有用である。このようなプローブとしての核酸はあまりに分子量が大きいと取扱が困難と

なるため、40塩基乃至1209塩基が例示され、より好ましくは50塩基乃至500塩基、最も好ましくは60塩基乃至300塩基が例示される。合成オリゴヌクレオチドのプロープ又はプライマーとして利用する場合には、少なくとも10塩基以上、好ましくは、15塩基以上、より好ましくは20塩基以上である。好ましくは50塩基以下である。

なお、ここで「ストリンジेंटな条件下」とは、中程度又は高程度なストリンジेंटな条件においてハイブリダイズすることを意味する。具体的には、中程度のストリンジेंटな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、一般の技術を有する当業者によって、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Vol.1、7.42-7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH8.0)の前洗浄溶液、約40-50℃での、約50%ホルムアミド、2×SSC-6×SSC（又は約42℃での約50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液)のハイブリダイゼーション条件、および約60℃、0.5×SSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。高ストリンジेंटな条件もまた、例えばDNAの長さに基づき、当業者によって、容易に決定することが可能である。一般的に、こうした条件は、中程度にストリンジेंटな条件よりも高い温度及び／又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を含み、例えば上記のようなハイブリダイゼーション条件、及びおよそ68℃、0.2×SSC、0.1% SDSの洗浄を伴うと定義される。当業者は、温度および洗浄溶液塩濃度は、プローブの長さ等の要因に従って、必要に応じて調整可能であることを認識するであろう。

「本発明核酸」は例えば以下の方法により調製することが可能である。

公知のβ3グルクロン酸転移酵素7 (β3GnT7) の塩基配列 (GenBank Accession No. AK000770) (配列番号10) をクエリーとして塩基配列の検索を行ない、EST (GenBank Accession No. BC004908) の相補配列を得ることができた。この相補配列又はその一部を利用して、ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等の遺伝子工学の基本的手法を用いてcDNAライブラリーなどから本発明核酸 (例えば本発明DNA) を調製することができる。上記相補配列がコードするアミノ酸配列 (配列番号

2) はN末端に膜貫通領域を有することが予測されるので、この膜貫通領域を有しないポリペプチドをコードする塩基配列の領域を調製すると、可溶化形態のポリペプチドをコードする「本発明核酸」が得られる。

配列番号2のアミノ酸配列より、アミノ酸番号1乃至55が膜貫通領域である
5 。よって、当該領域の全部又は一部を欠如したポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする核酸は、「可溶化形態のポリペプチドまたはその核酸」として本発明に含まれる。例えば「配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列」が挙げられ、このようなアミノ酸配列からなる可溶化形態のポリペプチドをコードする核酸としては、「配列番号1記載の塩基番号166乃至1
10 209からなる塩基配列からなる核酸」が例示される。このような核酸の調製は、例えば配列番号3記載の配列を5'プライマー（配列番号3の塩基番号32-56は、配列番号1の塩基番号166-190に対応する）、配列番号4記載の配列を3'プライマー（配列番号4の塩基番号31-55は、配列番号1の塩基番号1209-1185に対応する）として使用し、例えばヒトゲノムcDNAライブラリーを鋳型として常法に従って核酸増幅反応を行うことで調製することができる。
15

ここで、核酸増幅反応は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）[Saiki R. K., et al., Science, 230, 1350-1354 (1985)]、ライゲース連鎖反応（LCR）[Wu D. Y., et al., Genomics, 4, 560-569 (1989); Barringer K. J., et al., Gene, 89, 117-122 (1990); Barany F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 189-193 (1991)] 及び転写に基づく増幅 [Kwoh D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173-1177 (1989)] 等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応（SDA）[Walker G. T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396 (1992); Walker G. T., et al., Nuc. Acids Res., 20, 1691-1696 (1992)]、
20 自己保持配列複製（3SR）[Guatelli J. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1874-1878 (1990)] およびQ β レプリカーゼシステム [リザイルディら、BioTechnology 6, p.1197-1202 (1988)] 等の恒温反応を含む。また、欧州特許第0525882号に記載されている標的核酸と変異配列の競合増幅による核酸配列に基づく増幅（Nucleic Acid Sequence Based Amplification: NASABA）反応等も利用可能で

ある。好ましくはPCR法である。

配列番号 3 及び 4 のプライマーを使用した場合、PCR産物として約1.1kbpのDNA断片が得られるので、これを例えばアガロースゲル電気泳動等の分子量によりDNA断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って

5 単離して「本発明核酸」を得ることができる。

上記のようなハイブリダイゼーション、核酸増幅反応等を使用してクローニングされる相同な核酸は、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらになお好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上

10 上の同一性を有する。

同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって決定することが可能である。あるいは、2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereuxら, Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984に記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピュータグループ(UWGCG)より入手可能なGAPコンピュータプログラム、バージョン6.0を用いて、配列情報を比較することによって、決定可能である。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには:(1)ヌクレオチドに関する単一(unary)比較マトリックス(同一に対し1および非同一次元に対し0の値を含む)、並びにSchwartz及びDayhoff監修, Atlas of Protein Sequence and Structure, pp.353-358, National Biomedical Research Foundation, 1979に

15 記載されるような、Gribskov及びBurgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986の加重比較マトリックス;(2)各ギャップに対する3.0のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに0.10のペナルティ;及び(3)末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、使用可能である。

20

25 (3) 本発明のベクター及び形質転換体

本発明によれば、単離した「本発明核酸」を含む組換えベクターが提供される。プラスミド等のベクターに本発明核酸のDNA断片を組込む方法としては、例えば、Sambrook, J.ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.1 (2001)に記載の方法などが挙げられる。簡

便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞（例えば、大腸菌DH5 α 、TB1、LE392、又はXL-LE392又はXL-1Blue等）に導入される。

- 5 プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、Sambrook, J.ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 16.1 (2001)に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。
- 10 ベクターは、簡単には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、プラスミドDNA等）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、pDONR201、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322等が例示されるが、これらに限定されない。
- 15 当業者であれば制限末端は発現ベクターに適合するように適宜選択することが可能である。発現ベクターは、「本発明タンパク質を発現させたい宿主細胞」に適したものを当業者であれば適宜選択することができる。このように本発明発現ベクターは上記の本発明核酸が目的の宿主細胞中で発現しうるように遺伝子発現に
20 関与する領域（プロモーター領域、エンハンサー領域、オペレーター領域等）が適切に配列されており、さらに本発明核酸が適切に発現するように構築されていることが好ましい。また、発現ベクターの構築は、制限処理及び連結作業を必要としない、Gatewayシステム（インビトロジェン社）を用いることもできる。Gatewayシステムとは、PCR産物の方向性を維持したままクローニングができ、また、DNA断片を適切に改変した発現ベクターにサブクローニングを可能にした
25 部位特異的な組換えを利用したシステムである。具体的には、PCR産物とドナーベクターとから部位特異的な組換え酵素であるBPクロナーゼによってエントリークローンを作成し、その後、このクローンと別の組換え酵素であるLBクロナーゼによって組換え可能なデスティネーションベクターにPCR産物を移入することにより、発現系に対応した発現クローンを調製するものである。最初にエ

ントリークローンを作成すれば、制限酵素やリガーゼで作業する手間の係るサブクローニングステップが不要である点を特徴の一つとする。

5 発現ベクターの種類は、原核細胞及び／又は真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420などが好ましく、酵母用発現ベクターとしてpYES2（サッカロマイセス属）、pPIC3.5K、pPIC9K、pA0815（以上ピキア属）、昆虫用発現ベクターとしてpFastBac、pBacPAK8/9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5などが好ましい。

10 上記「本発明発現ベクター」を宿主細胞に組み込み、形質転換体を得ることができる。上記「宿主細胞」として真核細胞（ほ乳類細胞、酵母、昆虫細胞等）であっても原核細胞（大腸菌、枯草菌等）であっても使用することができる。本発明の形質転換体をえるための宿主細胞は、特に限定されず、さらに、または、ヒト（例えば、HeLa、293T、SH-SY5Y）、マウス（例えば、Neuro2a、NIH3T3）等由来の培養細胞でもよい。これらはいずれも公知であり、市販されているか（例えば、大日本製薬社）、あるいは公共の研究機関（例えば、理研セルバンク）より入手可能である。あるいは、胚、器官、組織若しくは非ヒト個体も使用可能である。

20 ところで「本発明核酸」はヒトゲノムライブラリーから発見された核酸であるため、本発明においては真核細胞を本発明の形質転換体の宿主細胞として用いるとより天然物に近い性質を有した「本発明タンパク質」が得られる（例えば糖鎖が付加された態様など）と考えられる。従って、「宿主細胞」としては真核細胞、特にほ乳類細胞を選択することが好ましい。ほ乳類細胞としては、具体的には、マウス由来、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。また、宿主細胞としての大腸菌、酵母又は昆虫細胞は、具体的には、大腸菌（DH5α、M15、JM109、BL21等）、酵母（INVSc1（サッカロマイセス属）、GS115、KM71（以上ピキア属）など）、昆虫細胞（Sf21、BmN4、カイコ幼虫等）などが例示される。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター／オペレーター領域、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成される

宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでもよい。

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGA、TAAなど）が例示される。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたプラスミド）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coliではプラスミドpQE30、pET又はpCAL若しくはそれらの人工的修飾物（pQE30、pET又はpCALを適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母ではプラスミドpYES2若しくはpPIC9Kが、また昆虫細胞ではプラスミドpBacPAK8/9等があげられる。

エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的か

つ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4 DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

- 5 本発明の発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（形質移入）〕は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（*E. coli*, *Bacillus subtilis*等）の場合は、例えばCohenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法〔*Mol. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979)〕やコンピテント法〔*J. Mol. Biol.*, 56, 209 (1971)〕によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1927 (1978)〕やリチウム法〔*J. Bacteriol.*, 153, 163 (1983)〕によって、植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法〔*Science*, 227, 129 (1985)〕、エレクトロポレーション法〔*Nature*, 319, 791 (1986)〕によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法〔*Virology*, 52, 456 (1973)〕、昆虫細胞の場合は、例えばSummerらの方法〔*Mol. Cell Biol.*, 3, 2156-2165 (1983)〕によってそれぞれ形質転換することができる。

(4) 本発明タンパク質の単離・精製

近年は遺伝子工学的手法として、形質転換体を培養、生育させてその培養物、生育物から目的物質を単離・精製する手法が確立されている。

- 20 本発明タンパク質は、例えば、上記の如く調製された発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することによって発現（生産）することができる。栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖、メタノールなどが、例示される。無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また、所望により他の栄養素（例えば無機塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、ア

ンピシリン、カナマイシン等)など)を含んでいてもよい。培養は、当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpH及び培養時間は、本発明のタンパク質が大量に生産されるように適宜選択される。

本発明のタンパク質は、上記培養により得られる培養物より以下のようにして
5 取得することができる。すなわち、本発明のタンパク質が宿主細胞内に蓄積する場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞を集め、これを適当な緩衝液(例えば濃度が10～100mM程度のトリス緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液などの緩衝液。pHは用いる緩衝液によって異なるが、pH5.0～9.0の範囲が望ましい)に懸濁した後、用いる宿主細胞に適し
10 た方法で細胞を破壊し、遠心分離により宿主細胞の内容物を得る。一方、本発明のタンパク質が宿主細胞外に分泌される場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞と培地を分離し、培養ろ液を得る。宿主細胞破壊液、あるいは培養ろ液はそのまま、または硫酸沈殿と透析を行なった後に、本発明のタンパク質の単離・精製に供することができる。単離・精製の方法としては、以下の方法が挙げ
15 ることができる。即ち、当該タンパクに6×ヒスチジンやGST、マルトース結合タンパクといったタグを付けている場合には、一般に用いられるそれぞれのタグに適したアフィニティークロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。一方、そのようなタグを付けずに本発明のタンパク質を生産した場合には、例えば後述する実施例に詳しく述べられている方法、即ちイオン交換クロマトグ
20 ラフィーによる方法を挙げることができる。また、これに加えてゲルろ過や疎水性クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィーなどを組み合わせる方法も挙げることができる。

本発明タンパク質を、糖タンパク質、オリゴ糖または多糖等に作用させることにより、N-アセチルグルコサミンが転移される。従って、本発明タンパク質は
25 、糖タンパク質の糖鎖の修飾や、糖類の合成に用いることができる。さらに、本発明タンパク質を免疫原として動物に投与することにより、該タンパク質に対する抗体を作製することができ、該抗体を用いて免疫測定法により該タンパク質を測定することが可能になる。従って、本発明タンパク質及びこれをコードする核酸は、このような免疫原の作製に有用である。

本発明発現ベクターはそのような本発明タンパク質の単離・精製が容易となるように構築されていることが好ましい。特に「本発明タンパク質」を「酵素活性を有するポリペプチド（例えば上述の（A）、（A'）又は（A''）記載のポリペプチド）」と「標識ペプチド」との「融合タンパク質」の形態で発現するように構築した「本発明発現ベクター」を用いて遺伝子工学的に「本発明タンパク質」を調製すると単離・精製が容易となるため好ましい。

上記「識別ペプチド」の例としては、「本発明タンパク質」を遺伝子組み換えによって調製する際に、該「識別ペプチド」と「酵素活性を有するポリペプチド」とが結合した「融合タンパク質」として発現させることにより、形質転換体の生育物から「本発明タンパク質」の分泌・分離・精製又は検出を容易にすることを可能とする機能を有したペプチドである。このような「識別ペプチド」としては、例えばシグナルペプチド（多くのタンパク質のN末端に存在し、細胞内の膜透過機構においてタンパク質の選別のために細胞内では機能している15～30アミノ酸残基からなるペプチド：例えばOmpA、OmpT、Dsb等）、プロテインキナーゼA、プロ

10 テインA（黄色ブドウ球菌細胞壁の構成成分で分子量約42,000のタンパク質）、グルタチオンS転移酵素、Hisタグ（ヒスチジン残基を6乃至10個並べて配した配列）、mycタグ（cMycタンパク質由来の13アミノ酸配列）、FLAGペプチド（8アミノ酸残基からなる分析用マーカー）、T7タグ（gene10タンパク質の最初の11アミノ酸残基からなる）、Sタグ（脾臓RNaseA由来の15アミノ酸残基からなる）、HSVタグ、pe

15 1B（大腸菌外膜タンパク質pelBの22アミノ酸配列）、HAタグ（ヘマグルチニン由来の10アミノ酸残基からなる）、Trxタグ（チオレドキシン配列）、CBPタグ（カルモジュリン結合ペプチド）、CBDタグ（セルロース結合ドメイン）、CBRタグ（コラーゲン結合ドメイン）、 β -lac/blu（ β ラクタマーゼ）、 β -gal（ β ガラクトシダーゼ）、luc（ルシフェラーゼ）、HP-Thio（His-patchチオレドキシン）、HSP（熱ショックペプチド）、Ln γ （ラミニン γ ペプチド）、Fn（フィブロネクチン部分ペプチド）、GFP（緑色蛍光ペプチド）、YFP（黄色蛍光ペプチド）、CFP（シアン蛍光ペプチド）、BFP（青色蛍光ペプチド）、DsRed、DsRed2（赤色蛍光ペプチド）、MBP（マルトース結合ペプチド）、LacZ（ラクトースオペレーター）、IgG（免疫グロブリンG）、アピジン、プロテインG等のペプチドが挙げられ、何れの識別ペプチドであっ

でも使用することが可能である。その中でも特にシグナルペプチド、プロテイン
キナーゼA、プロテインA、グルタチオンS転移酵素、Hisタグ、mycタグ、FLAGペプ
チド、T7タグ、Sタグ、HSVタグ、pelB又はHAタグが、遺伝子工学的手法による本
発明タンパク質の発現、精製がより容易となることから好ましく、特にFLAGペプ
チド (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (配列番号6) との融合タンパ
ク質として「本発明タンパク質」を得るのが、取扱面で極めて優れているため好
ましい。上記FLAGペプチドは非常に抗原性であり、そして特異的なモノクローナ
ル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現された組換えタンパク質の
迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11と称されるネズミハイブリ
ドーマは、本願明細書に援用される米国特許第5,011,912に記載されるように、特
定の二価金属陽イオンの存在下で、FLAGペプチドに結合するモノクローナル抗体
を産生する。4E11ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号HB 9259下に、アメリカン・
タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) に寄
託されている。FLAGペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak
Co., Scientific Imaging Systems Division、コネチカット州ニューヘブーンより
入手可能である。

ほ乳類細胞で発現可能であって、かつ上述のFLAGペプチドとの融合タンパク質
として「本発明タンパク質」を得ることができる基本ベクターとしては例えばpF
LAG-CMV-1 (シグマ社)、pFBIF (pFastBac (インビトロジェン社) にFLAGペプチド
をコードする領域を組み込んだベクター：後述の実施例参照) 等が例示されるが
、当業者であれば「本発明タンパク質」の発現に使用する宿主細胞、制限酵素、
識別ペプチドなどから判断して適当な基本ベクターを選択することが可能である
。

なお、本発明によって「本発明核酸の塩基配列」が開示されたため、当業者で
あれば目的とする「本発明核酸」や調製したい「本発明核酸の一部の領域」の両
端の塩基配列を基に適宜プライマーを作成し、それを用いてPCR法などによって目
的の領域を増幅して調製することが容易である。

(5) 本発明測定用核酸

本発明によれば、本発明核酸とハイブリダイズする核酸 (以下、「測定用核酸」

と称する) が提供される。本発明測定用核酸は、典型的には、本発明タンパク質をコードする核酸の天然由来の又は合成されたフラグメントであり、プライマー又はプローブを含むが、これらに限定されるものではない。なお、本明細書において使用される用語「測定」には、検出、増幅、定量、および半定量のいずれも

5 が包含される。

(a) プライマー

本発明測定用核酸を核酸増幅反応用のプライマーとして使用する場合、本発明測定用核酸は、オリゴヌクレオチドであって、

配列番号 2 に示すタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から以下の条件を満たすように 2 つの領域を選択し：

10

- 1) 各領域の長さが 15 - 50 塩基であること；
- 2) 各領域中の G + C の割合が 40 - 70 % であること；

上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA を製造し、または、上記一本鎖 DNA によってコードされるアミノ酸残基を変化させないように遺伝子暗号の縮重を考慮した一本鎖 DNA の混合物を製造し、さらに必要であれば上記タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖 DNA を製造する

15

ことを含む方法により製造された当該オリゴヌクレオチドが提供される。

本発明のプライマーは、本発明核酸の部分領域と相同的な配列を有することが好ましいが、1 または 2 塩基の不一致があっても差し支えない。

20

なお、本発明のプライマーの塩基数は 15 塩基以上、好ましくは 18 塩基以上、より好ましくは 21 塩基以上であり、50 塩基以下である。

本発明のプライマーは、典型的には、配列番号 7 (配列番号 1 の塩基番号 683 - 701 に対応する) 及び配列番号 8 (配列番号 1 の塩基番号 775 - 755 に対応する) の塩基配列を有し、単独、又はプライマー対として用いることができる。

25

(b) プローブ

本発明測定用核酸をプローブとして使用する場合、本発明測定用核酸は、配列番号 1 に記載の塩基配列の全体又は部分領域と相同的な配列を有することが好ま

しい。本発明の測定用核酸が、cDNAプローブの場合、塩基数は、10塩基以上、好ましくは15塩基以上で、最長で、コード領域の全長、即ち、1209塩基である。配列番号1に記載した塩基配列又はその相補的な塩基配列と50%以下、好ましくは20%以下の不一致があっても、プローブとしての機能を果たし得る。また、本発明の測定用核酸が、合成オリゴヌクレオチドの場合、塩基数は15塩基以上、好ましくは20塩基以上である。合成オリゴヌクレオチドの場合、長さによるが、配列番号1に記載した塩基配列又はその相補的な塩基配列と1または2塩基程度の不一致があってもプローブとしての機能を果たしうる。

本発明のプローブは、例えば、配列番号9に記載された塩基配列を有する。これは、配列番号1の塩基番号707-724の相当し、配列番号7および8をプライマーとして核酸増幅反応を行った場合、その増幅産物にハイブリダイズして検出する。

本発明のプローブには、該プローブが標的配列とハイブリダイズしたことを検出または確認するために、蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブが含まれる。被検核酸またはその増幅物を固相化し、標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中に被検核酸が存在するかを決定することができる。

一般的に、PCRのような核酸増幅法自体は、当該技術分野において周知であり、そのための試薬キットおよび装置も市販されているので容易に行うことができる。上記した本発明のプライマー対を用い、被検核酸を鋳型として用いて核酸増幅法を行うと、被検核酸が増幅されるのに対し、検体中に被検核酸が含まれない場合には増幅が起きないので、増幅産物を検出することにより検体中に被検核酸が存在するか否かを知ることができる。増幅産物の検出は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。また、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いた定量的RT-PCRを行うことにより、検体中の被検核酸の量を定量することも可能である。なお、定量的RT-PCR用のキットも市販されているので、容易に行うことができ

る。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて被検核酸を半定量することも可能である。なお、被検核酸は、mRNAでも、mRNAから逆転写したcDNAであってもよい。被検核酸としてmRNAを増幅する場合には、上記一对のプライマーを用いたNASBA法(3SR法、TMA法)を採用することもできる。NASBA法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一对のプライマーを用いて容易に実施することができる。

(6) 本発明検定方法

本発明者らは、本発明の新規 β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質、及び/又は核酸の発現量が、癌組織において正常組織よりも多いことを見出した。よって、本発明の生物試料中において本発明のタンパク質または核酸を定量し、対照の正常な生物試料中の相当する量と比較することにより、生物試料の癌化を検定することが可能である。

具体的には、本発明は、生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 生物試料中の本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を定量し；そして

(b) 生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値の1.5倍以上である場合には癌化していると判断する

工程を含む、前記方法を提供する。

また、本発明の検定方法は、

(a) 生物試料中の本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質の全部又は一部をコードする核酸を定量し；そして

(b) 生物試料中の前記核酸の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記核酸の定量値の1.5倍以上である場合には癌化していると判断する

工程を含む、ものであってもよい。

上記のように、本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を癌マーカーとして定量する場合には、例えば、該タンパク質を免疫原として作成される抗体を用いることができる。抗体を利用したタンパク質の定量方法としては、当該技術分野における周知な方法、例えば、ELISA法、ウエス

タンブロット法を使用することが可能である。また、本発明の糖転移酵素タンパク質の活性を利用することによって、定量することもできる。前記定量値の比は、1.5倍以上、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは5倍以上、さらにより好ましくは10倍以上、最も好ましくは20倍以上である。

また、本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質の全部又は一部をコードする核酸を癌マーカーとして定量する場合には、本発明の検定方法は、

(a-1) 生物試料中の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質の全部又は一部をコードする核酸に本発明の測定用核酸から選択される一対のプライマーをハイブリダイズさせ；

(a-2) β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質の全部又は一部をコードする核酸を増幅させ；

(a-3) 前記増幅産物を定量し；そして

(b) 前記定量値が、対照の正常な生物試料中の対応する定量値の1.5倍以上である場合には癌化していると判断する工程を含む、ものであってもよい。

本発明検定方法への利用できる核酸は、本発明測定用核酸として例示されるが、特に限定されず、例えば、配列番号1記載の塩基番号1乃至1206からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列から選択される、任意の配列を利用可能である。配列番号1記載の塩基番号683乃至775からなる塩基配列からなる核酸又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸（本発明核酸1）を使用することが好ましい。即ち、本発明検定方法によって生物試料において検出される核酸（特にmRNA）は、配列番号1記載の塩基配列番号683乃至775からなる塩基配列を含む核酸であることが好ましいが、具体的には、配列番号1記載の塩基番号683乃至775からなる塩基配列からなる核酸、配列番号1記載の塩基番号166乃至1209からなる塩基配列からなる核酸、及び配列番号1記載の塩基番号1乃至1209からなる塩基配列からなる核酸が例示される。

これらの核酸の発現量は、例えば、本発明測定用核酸を使用したPCR法を用

いて定量することができる。PCR法では、定量的PCR法の使用が好ましく、キネティックス分析のためのRT-PCR法、定量的リアルタイムPCR法が例示される。本発明によれば、核酸の定量には、これらに限定されるものではなく、ノーゼンブロット、ドットブロット、DNAマイクロアレイを使用することも可能である。一方、同一組織等に広く一般的に存在する遺伝子の核酸、例えばグリセルアルデヒド-3リン酸-脱水素酵素 (GAPDH)、 β -アクチンをコードする核酸を対照として利用することができる。癌化していると判断されるシグナルの定量比は、1.5以上であり、好ましくは2以上、より好ましくは3以上、さらに好ましくは5以上、さらにより好ましくは10以上、最も好ましくは20以上である。

本明細書において、「生物試料」というときは、器官、組織及び細胞を示すが、好ましくは組織であり、具体的には、食道、胃、脾臓、肝臓、腎臓、十二指腸、小腸、大腸、直腸、結腸が例示される。好ましくは大腸、直腸、及び結腸であり、より好ましくは大腸である。

本発明検定方法は、上記の通り、生物試料の癌化を検定するものであり、医療における癌の診断、治療等に応用することができる。本明細書において使用される用語「癌」には、典型的には、悪性腫瘍全般をいい、該悪性腫瘍による疾病状態を含む。本発明検定方法は、限定されるわけではないが、食道癌、胃癌、脾臓癌、肝臓癌、腎臓癌、十二指腸癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌、及び結腸癌、好ましくは大腸癌、直腸癌、及び結腸癌であり、より好ましくは大腸癌の検定に適している。

(7) 本発明抗体

本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質に免疫反応性である抗体が本明細書に提供される。こうした抗体は、(非特異的結合と対照的に) 抗体の抗原結合部位を介して、該糖転移酵素タンパク質に特異的に結合する。したがって、上述のような、配列番号2のタンパク質、断片、変異体、融合タンパク質などを、それと免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用することが可能である。より具体的には、タンパク質、断片、変異体、融合タンパク質などは、抗体形成を引き出す抗原決定基またはエピトープを

含む。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖でも高次構造的 (conformational) (断続的) でもどちらでもよい。なお、該抗原決定基またはエピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によって同定してもよい。

したがって、本発明の1つの側面は、本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質の抗原性エピトープに関する。こうしたエピトープは、以下により詳細に記載されるように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。さらに、本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質のエピトープは、アッセイにおいて、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマ由来の上清などの物質から特異的に結合する抗体を精製する研究試薬として使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、タンパク質の化学的または酵素的切断などの、当該技術分野に公知の技術を用いて、あるいは組換えDNA技術を用いて、產生することが可能である。

前記糖転移酵素タンパク質によって誘導される可能性がある抗体に関しては、該タンパク質の全部若しくは一部が単離されていても、またはエピトープが単離されていても、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はどちらも、慣用的技術によって調製することが可能である。例えば、Kennetら (監修), *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, 1980を参照されたい。

本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって產生しそして同定することが可能である。こうしたハイブリドーマ細胞株を產生するための1つの方法は、動物を該糖転移酵素タンパク質で免疫し；免疫された動物から脾臓細胞を採取し；前記脾臓細胞を骨髓腫細胞株に融合させ、それによりハイブリドーマ細胞を生成し；そして該タンパク質に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含む。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。

本発明のモノクローナル抗体には、キメラ抗体、例えば、ネズミモノクローナ

ル抗体のヒト化型が含まれる。こうしたヒト化抗体を既知の技術によって調製し、そして抗体がヒトに投与されるとき、免疫原性の減少という利点を提供してもよい。

慣用的技術によって産生可能な、抗体の抗原結合断片もまた、本発明に含まれる。こうした断片の例には、限定されるわけではないが、F a bおよびF (a b ')₂断片が含まれる。遺伝子工学技術によって産生される抗体断片および誘導体もまた提供される。

本発明の抗体は、in vitro又はin vivoいずれかで、前記糖転移酵素タンパク質または断片の存在を検出するアッセイで用いることが可能である。抗体はまた、
10 免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、本発明のポリペプチドまたは断片を精製する際にも使用可能である。

さらに、結合パートナー、例えば受容体基質への本発明のタンパク質の結合を遮断することが可能な抗体を用いて、こうした結合から生じる生物学的活性を阻害することが可能である。こうした遮断抗体は、受容体基質を発現している特定
15 の細胞への該タンパク質の結合を阻害する能力に関して、抗体を試験することによるなど、いかなる適切なアッセイ法を用いて、同定してもよい。あるいは、遮断抗体は、標的細胞の結合パートナーに結合している本発明タンパク質から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいて、同定することが可能である。

こうした抗体を、in vitro法で使用するか、又はin vivoで投与して、抗体を生成した実体によって仲介される生物学的活性を阻害することが可能である。したがって、本発明の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質と結合パートナーとの相互作用によって、(直接または間接的に)引き起こされるかまたは悪化される障害を治療することが可能である。療法は、結合パート
20 ナー仲介生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、ほ乳動物にin vivo投与することを伴う。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。1つの態様において、抗原結合抗体断片が使用される。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もつとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1 本発明DNA及び本発明タンパク質の調製方法

- 5 β 3グルクロン酸転移酵素7 (β 3GnT7) の塩基配列 (GenBank Accession No. AK000770) (配列番号 10) をクエリーとして、BLAST検索を行った。その結果、EST (GenBank Accession No. BC004908) の相補配列が β 3GnT7 とホモロジーを有することが判明した。相補配列は配列番号 1 の通りであった。この塩基配列がコードするアミノ酸配列 (配列番号 2) はN末端に膜貫通領域を有することが予測され、
- 10 この膜貫通領域を有しないタンパク質をコードする塩基配列の領域を調製することとした。調製は、Gatewayシステム (インビトロジェン社) を利用して、pFast Bac (インビトロジェン社) の誘導体であるpFBIFに遺伝子を組み込み、Bac-to-Bacシステム (インビトロジェン社) によるバクミドを作成して行った。

(1) エントリークロンの調製

- 15 ヒトゲノムcDNA (クロンテック社製) を鋳型とし、5' プライマーとして配列番号 3 記載の塩基配列からなるDNA (配列番号 3 の塩基番号 32-56 は、配列番号 1 の塩基番号 166-190 に対応する)、3' プライマーとして配列番号 4 記載の塩基配列からなるDNA (配列番号 4 の塩基番号 31-55 は、配列番号 1 の塩基番号 1209-1185 に対応する) を使用してPCR法を行った。PCR法は96℃
- 20 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を30サイクル繰り返す条件で行った。そしてPCR産物をアガロースゲル電気泳動を行い、ゲル切り出し法でゲルを切り出して常法により単離した。このようにして単離したPCR産物をBPクローナーゼ反応によってpDONR201 (商標) (インビトロジェン社製) へ組み込んで「エントリークロン」を作成した。反応は上記PCR産物2 μ l、pDONR201 1 μ l (150ng)、BP反応緩衝液2 μ l、トリ
- 25 スーEDTA緩衝液 (pH8.0: 以下「TE」とも略記する) 3 μ l、BPクローナーゼmix 2 μ l を25℃で1時間インキュベーションして行った。その後、プロテイナーゼK (科研製薬株式会社製) を1 μ l加えて37℃、10分間インキュベートして反応を終了させた。その反応混合液11 μ lをコンピテントセル (大腸菌DH5 α) 100 μ lと混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシンを含むLBプレートに播いた

。翌日コロニーを回収し、PCR法で目的DNAが導入されていること及びその塩基配列を確認し、挿入されたベクター（pDONR-G26A）を常法に従って抽出、精製した。このベクターに挿入されたDNAの塩基配列は、配列番号1記載の塩基配列のうち、塩基番号166乃至1209からなる塩基配列を含むことが確認された。

5 (2) 発現クローンの調製

上記エントリークローンは、挿入部位の両端に入ファージが大腸菌から切り出される際の組換え部位であるattLを持つもので、LRクロナーゼ（入ファージの組換え酵素Int、IHF、Xisを混合したもの）とデスティネーションベクター（attRを有する）とを混合することで、挿入部位がデスティネーションベクターに移り、発現クローンが作成される。

1 μ lのエントリークローン（pDONR-G26A）、0.5 μ lのデスティネーションベクター（pFBIF (75ng)）、LR反応緩衝液2 μ l、TE4.5 μ l、LRクロナーゼミックス（入ファージの組換え酵素Int、IHF、及びXisを混合した溶液）2 μ lを25℃で1時間インキュベートし、プロテイナーゼK（科研製薬株式会社製）を1 μ l加えて37℃で10
15 分間インキュベートして反応を停止させた（この組換え反応でpFBIF-G26Aが生成された）。pFBIFはpFastBac1（インビトロジェン社製）にIg κ シグナル配列（配列番号5）と精製用のFLAGペプチド（配列番号6）とを常法に従って挿入したものである。さらに、pFBIFにGateway配列（attR）を挿入するため、Gateway Vector Conversion System（インビトロジェン社）を用いて変換カセットを挿入した。こ
20 の変換カセットは、発現ベクターをデスティネーションベクターに改変するためのカセットであり、attR組換え部位、クロラムフェニコール耐性遺伝子、及び大腸菌DNA gyraseを阻害するタンパク質をコードするccdB遺伝子を有する。また、Ig κ シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAGタグは精製を容易と
するために挿入した。

25 pFBIF-G26Aが含まれる反応混液（11 μ l）とコンピテントセルである大腸菌DH5 α 100 μ lとを混合し、ヒートショック法による形質転換の後、アンピシリンを含むLB培地に組換えDH5 α を蒔いて培養した。24時間培養後、コロニーを回収し、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）によりプラスミド（pFBIF-G26A）を抽出精製した。PCR法で目的DNAが挿入されていることを確認した。

(3) Bac-to-Bacシステム（インビトロジェン社製）によるバクミドの調製

続いてBac-to-Bacシステム（インビトロジェン社製）を用いて上記pFBIF-G26Aとバクミドとの間で組換えを行い、昆虫細胞中で増殖可能なバクミドにG26Aの配列を挿入した。このシステムはTn7の組換え部位を利用して、バクミドを含む大腸菌（大腸菌DH10Bac（商標））に目的遺伝子を挿入させたpFastBac（即ち、pFBIF-G26A）を導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生させる組換えタンパク質によって目的とする遺伝子（G26A）がバクミドに取り込まれるシステムである。またバクミドにはLacZ遺伝子が含まれており、古典的なコロニーの色（青（挿入なし）－白（挿入あり））による選択が可能である。

- すなわち、上記精製ベクター（pFBIF-G26A）50 μ lとコンピテントセル（大腸菌DH10Bac）50 μ lとを混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、5-ブロモインドリル β -D-ガラクトピラノシド（Bluo-gal）、及びイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を含むLB培地に蒔き、24時間後にバクミドに目的DNAが挿入された白い独立したコロニーを回収し、更に培養を行った後、常法に従ってバクミドを回収した。

(4) バクミドの昆虫細胞への導入

- 回収したバクミドに目的DNAが挿入されていることを常法に従って確認し、バクミドを昆虫細胞（Sf21：インビトロジェン社製）に導入した。すなわち35mmのシャーレにSf21細胞 9×10^5 個/2mlに抗生物質を含むSf900SFM培地（インビトロジェン社製）を添加し、27℃で1時間細胞を接着させた。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して、lipid-DNA complexes溶液（A溶液（100 μ lのSf-900SFMに上記バクミド5 μ lを添加した混合物）とB溶液（100 μ lのSf-900SFMに6 μ lのCell FECTION Reagent（インビトロジェン社製）を添加した混合物）とを丁寧に混合して30分間程度室温でインキュベートして得た溶液）にSf900II（インビトロジェン社製）800 μ lを添加した培養液を添加して27℃で5時間インキュベーションした。その後、培地を除去し、抗生物質を含むSf900SFM培地2mlを添加し、27℃で72時間インキュベートした。培養後ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収して1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「一次ウイルス液」とした）。

更にT75培養フラスコにSf21細胞 1×10^7 個/20ml Sf-900SFM（抗生物質を含む）を添加し、27℃で1時間インキュベートした。細胞が接着した後、一次ウイルス液800 μ lを添加し、27℃で48時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収した。これを1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「二次ウイルス液」とした）。

さらに、T75培養フラスコにSf21細胞 1×10^7 個/20ml Sf-900SFM（抗生物質を含む）を添加し、27℃で1時間インキュベートした。細胞が接着した後、二次ウイルス液1000 μ lを添加し、27℃で84時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収した。これを1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「三次ウイルス液」とした）。

さらに、Sf21細胞を 6×10^5 個/mlの濃度で含むSf-900SFM（抗生物質を含む）を100ml用スピナーフラスコに100 μ l添加し、三次ウイルス液1mlを添加し、27℃で96時間培養した。培養後、細胞と培養液を回収した。これを1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「四次ウイルス液」とした）。

四次ウイルス液10mlに対し、アジ化ナトリウム、塩化ナトリウム及び塩化カルシウムを加えた。終濃度はアジ化ナトリウムを0.05%、塩化ナトリウムを150mM、塩化カルシウムを2mMとした。抗FLAG抗体ゲル（Anti-Flag M1 monoclonal antibody Agarose Affinity Gel、シグマ社製）を50 μ l添加し、4℃で16時間緩やかに転倒混和した。遠心分離（1,000 \times g、3分、4℃）して上清を除去した後、1mMの塩化カルシウムを含むTBS（Tris-NaCl緩衝液：pH7.4）で2回洗浄した。そして洗浄後のアフィニティーゲルを1mMの塩化カルシウムを含むTBS（pH7.4）200 μ lに懸濁して、この懸濁液を活性測定用のG26酵素液とした。

実施例2 本発明タンパク質の酵素活性

配列番号2記載のアミノ酸配列を基に、他の公知の糖転移酵素と対比した結果、活性部位と考えられるC-末端領域の配列の保存性などから、G26は β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン転移酵素類に分類されることが示唆された。そこでUDP-GlcNAcをGlcNAc供与体基質として用いてG26酵素液の酵素活性の確認を行った。

GlcNAc受容体基質としては、GalNAc α 1-Bz、GalNAc β 1-pNp、GlcNAc α 1-Bz、
GlcNAc β 1-Bz、Gal α 1-pNp、Gal β 1-oNp、Xyl β 1-pNp、Fuc α 1-pNp、Man
 α 1-Bz、ManNAc α 1-Bz、Gal β 1-4Glc β 1-Bz（以上全てシグマ社製）、及びGa
1 β 1-4GlcNAc α 1-pNp（トロントリサーチケミカル社製）の全てを同時に用い、
5 各々最終濃度で10nmolずつ含むように反応液を調製して活性を確認した。

反応液は最終濃度50mMのカコジル酸ナトリウム緩衝液（pHを6.6、7.0、及び7.
4の各実験系を調製した）、最終濃度0.4%のTriton（商標）CF-54（シグマ社製）
、最終濃度480 μ MのUDP-GlcNAc、175nCiのUDP-[14 C]GlcNAc、最終濃度20mMのMgCl
2、CoCl₂又はCuCl₂、10.1 μ lのG26酵素液、及び蒸留水を含む全量20 μ lとした。

10 反応液を37℃で16時間インキュベートし、その後蒸留水200 μ lを添加し、不溶
性画分を遠心分離（100×g、10分）により除去して上清画分を回収した。Sep-Pa
k plus C18 Cartridge（ウォーターズ社製：予め1mlのメタノールで1回、次いで1
mlの蒸留水で2回洗浄して平衡化したもの）に通筒し、上清に含まれるGlcNAc受容
体基質及び反応生成物を吸着させた。1mlの蒸留水でカラムを2回洗浄し、カラム
15 に吸着したGlcNAc受容体基質と反応生成物を1mlのメタノールで溶出した。溶出液
を5mlの液体シンチレーター（アマシャム バイオサイエンス株式会社製）と混和
し、シンチレーションカウンターを用いて放射能を測定した（図1）。

その結果、G26は20mMのMnCl₂又はMgCl₂存在下では何れのpHに於いても活性は確
認されたが、pH6.6よりもpH7.4の方が強い活性が観察された。EDTAにより二価金
20 属陽イオンをキレートした条件下では酵素活性は観察されなかったことから、G2
6は二価金属陽イオンを酵素反応に必要とすることが明らかとなった。

実施例 3 大腸癌組織における本発明DNA発現量の変化

定量的リアルタイムPCR法を用いてヒト大腸癌組織と同一患者の健常大腸組織
25 での本発明核酸（mRNA）の発現量を比較した。ヒト大腸癌組織及び健常大腸組織
のRNAを、RNeasy Mini Kit（キアゲン社製）で抽出し、Super-Script First-Str
and Synthesis System（インビトロゲン社製）を用いたoligo(dT)法によりsingl
e strand DNAとした。このDNAを鋳型として用いてプライマー（5' プライマー：
配列番号7（配列番号1の塩基番号683-701に対応する）、3' プライマー

：配列番号 8（配列番号 1 の塩基番号 7 7 5 - 7 5 5 に対応する）及びTaqMan MGBプローブ（配列番号 9）（配列番号 1 の塩基番号 7 0 7 - 7 2 4 に対応する）を用いてABI PRISM 7700（アプライドバイオシステムズ社製）により定量的リアルタイムPCR法を行なった。PCR反応の条件は、50℃で2分、95℃で10分で反応させた後、95℃で15秒、60℃1分を50回繰り返して行った（表 2）。

表 2

| 試料番号 | 健常組織 | 癌化組織 | 倍 率 |
|------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.04 | 0.73 | 18.25 |
| 2 | 0.06 | 0.48 | 8 |
| 3 | 0.05 | 0.24 | 4.8 |
| 4 | 0.093 | 0.147 | 1.581 |
| 5 | 0.3 | 0.307 | 1.023 |
| 6 | 0.183 | 0.527 | 2.88 |
| 7 | 0.05 | 1.46 | 29.2 |
| 8 | 0.493 | 1.05 | 2.13 |
| 9 | 0.34 | 0.71 | 2.088 |
| 10 | 0.513 | 1.79 | 3.489 |
| 平均 | 0.212 | 0.744 | 7.344 |
| 標準偏差 | 0.177 | 0.512 | 8.754 |

- 10 その結果、癌化した組織における本発明DNAの発現量は、健常組織と比較して平均して7倍以上に増加していることが明らかとなった。また、試料番号 1 - 10 のうちの8つ、即ち、被験者の80%以上が、2倍以上の発現量を示した。

参考文献

- 15 1. J. Biol. Chem., 250(9): 3303-9 (1975)
 2. Can. J. Biochem. Cell Biol., 61(9): 1049-1066 (1983)
 3. J. Biol. Chem., 257(17): 10235-10242 (1982)
 4. J. Biol. Chem., 258(10): 6162-73 (1983)
 5. J. Biol. Chem., 257(22): 13421-7 (1982)
 20 6. J. Biol. Chem., 275(42): 32598-602 (2000)

7. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96(2): 406-11 (1999)
8. Cell, 105(7): 957-69 (2001)
9. J. Biol. Chem., 276(5): 3498-507 (2001)
10. J. Biol. Chem., 276(25): 22032-40 (2001)
- 5 11. J. Biol. Chem., 277(15): 12802-9 (2002)
12. Biochem. Biophys. Res. Commun., 294(4): 843-8 (2002)
13. Nature, 406(6794): 411-5 (2000)
14. J. Biol. Chem., 259(21): 13385-90 (1984)
15. J. Biol. Chem., 255(23): 11253-61 (1980)
- 10 16. J. Biol. Chem., 274(5): 3215-21 (1999)
17. J. Biol. Chem., 275(15): 11106-13 (2000)
18. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(16): 8991-6 (1999)
19. J. Biol. Chem., 265(5): 2563-2568 (1990)

15 産業上の利用の可能性

本発明により新規な糖転移酵素及びそれをコードする核酸、並びに組織の癌化の新規な検定方法が提供される。

請求の範囲

1. 下記の性質を有する β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質。

- 5 活性: N-アセチル-D-グルコサミン供与体基質からN-アセチル-D-グルコサミン受容体基質にN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する。
- 基質特異性: (1) GalNAc、(2) GlcNAc、(3) Gal、(4) Xyl、(5) Fuc、(6) Man、(7) ManNAc、(8) Gal β 1-4Glc、及び(9) Gal β 1-4GlcNAcの何れかのN-アセチル-D-グルコサミン受容体基質に、N-アセチル-D-グルコサミン供与体
- 10 基質からN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する。

- ここで「GalNAc」とはN-アセチル-D-ガラクトサミン残基を示し、「GlcNAc」とはN-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「Gal」とはD-ガラクトース残基を示し、「Xyl」とはD-キシロース残基を示し、「Fuc」とはD-フコース残基を示し、「Man」とはD-マンノース残基を示し、「ManNAc」とはN-アセチル-D-マンノース残基を示し、「-」はグリコシド結合を示す。式中の数字は前記グリコシド結合が存在する糖環の炭素番号を示す。「 β 」は糖環1位の前記グリコシド結合のアノマーを示し、5位CH₂OH又はCH₃との位置関係がシスのものを「 β 」で示す。
- 15

金属イオン要求性: 二価金属陽イオンを酵素反応に必要とする。

- 20 反応pH: 中性近辺である。

2. 以下の(A)又は(B)のポリペプチドを含む β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質。

(A) 配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド;

- 25 (B) 配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、又は挿入したアミノ酸配列を有し、且つN-アセチル-D-グルコサミン受容体基質に、N-アセチル-D-グルコサミン供与体基質からN-アセチル-D-グルコサミン残基を転移する活性を有するポリペプチド。

3. 前記(A)のポリペプチドが、配列番号2記載のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列からなる、請求項2記載の糖転移酵素タンパク質。
4. 前記(A)のポリペプチドが、配列番号2記載のアミノ酸番号1乃至402からなるアミノ酸配列からなる、請求項2記載の糖転移酵素タンパク質。
- 5 5. 前記糖転移酵素タンパク質が、配列番号2のアミノ酸番号56乃至402からなるアミノ酸配列と少なくとも50%同一のアミノ酸配列を有する、請求項2ないし4のいずれか一項記載の糖転移酵素タンパク質。
6. 請求項2乃至5何れか一項記載のタンパク質をコードする塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸。
- 10 7. 配列番号1記載の塩基番号166乃至1206からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる、請求項6に記載の核酸。
8. 配列番号1記載の塩基番号1乃至1206からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる、請求項6に記載の核酸。
9. DNAであることを特徴とする請求項6乃至8何れか一項記載の核酸。
- 15 10. 請求項6乃至9何れか一項記載の核酸、又は当該核酸の塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする測定用核酸。
11. 配列番号1記載の塩基番号683乃至775からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列を含む、請求項10に記載の測定用核酸。
- 20 12. 前記測定用核酸が、プローブ、プライマーとして使用される、請求項10又は11記載の測定用核酸。
13. 前記測定用核酸が、癌マーカーとして使用される、請求項10乃至12何れか一項記載の測定用核酸。
14. DNAであることを特徴とする請求項10乃至13何れか一項記載の測定
- 25 用核酸。
15. 請求項6乃至14何れか一項記載の核酸を含むベクター。
16. 請求項15記載のベクターを含む形質転換体。
17. 請求項15記載の形質転換体を生育させ、 β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を発現させ、その生育物から前記糖転移

酵素を回収する、ことを含む、前記糖転移酵素タンパク質の製造方法。

18. 請求項1乃至5何れか一項記載の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を認識する抗体。

19. 生物試料の癌化を検定する方法であって、

5 (a) 生物試料中の請求項1ないし5の何れか一項記載の β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を定量し；そして

(b) 生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値の1.5倍以上である場合には癌化していると判断する

10 工程を含む、前記方法。

20. 請求項18記載の抗体を用いて β 1, 3-N-アセチル-D-グルコサミン糖転移酵素タンパク質を定量する、請求項19記載の検定方法。

21. 生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 生物試料中の請求項6記載の核酸を定量し；そして

15 (b) 生物試料中の請求項6記載の核酸の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記核酸の定量値の1.5倍以上である場合には癌化していると判断する
工程を含む、前記方法。

22. (a-1) 生物試料中の請求項6記載の核酸に請求項10記載の測定用核酸から選択される一対のプライマーをハイブリダイズさせ；

20 (a-2) 請求項6記載の核酸を増幅させ；

(a-3) 前記増幅産物を定量し；そして

(b) 前記定量値が、対照の正常な生物試料中の対応する定量値の1.5倍以上である場合には癌化していると判断する
工程を含む、請求項21記載の方法。

25 23. 配列番号1記載の塩基番号683-775からなる塩基配列又はそれに相補的な塩基配列を含む核酸を定量する、請求項21又は22に記載の方法。

24. 前記生物試料が、大腸由来の試料である、請求項21乃至23何れか1項記載の方法。

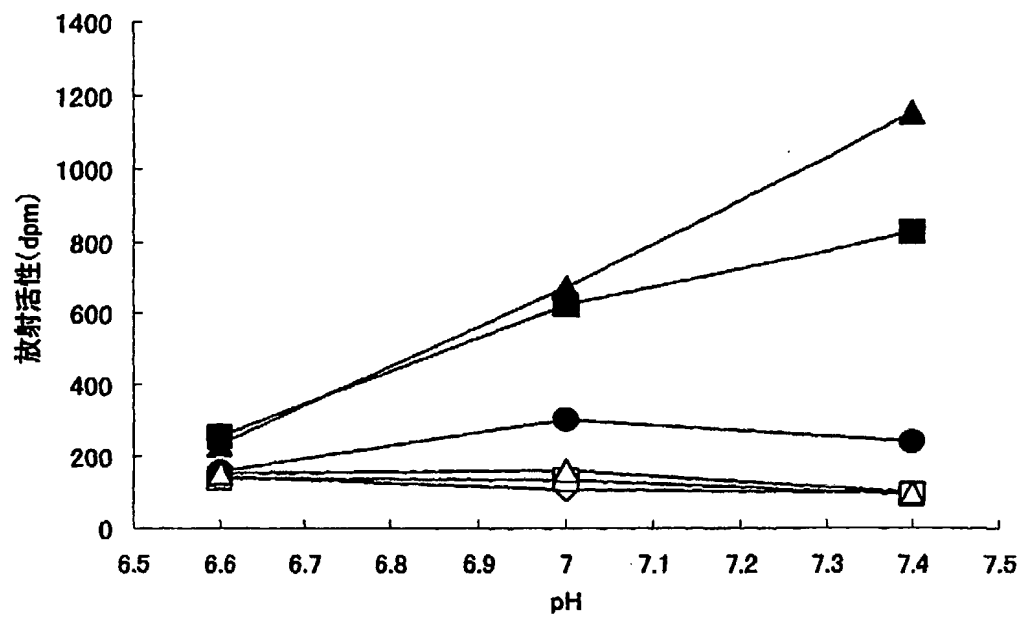


図 1

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Fujirebio Incorporated

<120> Glycosyltransferase and nucleic acid encoding the same, and a
method for detection for cancerous tissue by use of said nucleic
acid

<130> YCT-885

<150> JP2002-315451

<151> 2002-10-30

<160> 10

<210> 1

<211> 1209

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1209)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atg agg agg agg ctg cgc cta cgc agg gac gca ttg ctc acg ctg ctc | 48 |
| Met Arg Arg Arg Leu Arg Leu Arg Arg Asp Ala Leu Leu Thr Leu Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| ctt ggc gcc tcc ctg ggc ctc tta ctc tat gcg cag cgc gac ggc gcg | 96 |
| Leu Gly Ala Ser Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ala Gln Arg Asp Gly Ala | |
| 20 25 30 | |
| gcc ccg acg gcg agc gcg ccg cga ggg cga ggg agg gcg gca ccg agg | 144 |
| Ala Pro Thr Ala Ser Ala Pro Arg Gly Arg Gly Arg Ala Ala Pro Arg | |
| 35 40 45 | |
| ccc acc ccc gga ccc cgc gcg ttc cag tta ccc gac gcg ggt gca gcc | 192 |
| Pro Thr Pro Gly Pro Arg Ala Phe Gln Leu Pro Asp Ala Gly Ala Ala | |
| 50 55 60 | |
| ccg ccg gcc tac gaa ggg gac aca ccg gcg ccg ccc acg cct acg gga | 240 |
| Pro Pro Ala Tyr Glu Gly Asp Thr Pro Ala Pro Pro Thr Pro Thr Gly | |
| 65 70 75 80 | |
| ccc ttt gac ttc gcc cgc tat ttg cgc gcc aag gac cag cgg cgg ttt | 288 |
| Pro Phe Asp Phe Ala Arg Tyr Leu Arg Ala Lys Asp Gln Arg Arg Phe | |
| 85 90 95 | |
| cca ctg ctc att aac cag ccg cac aag tgc cgc ggc gac ggc gca ccc | 336 |
| Pro Leu Leu Ile Asn Gln Pro His Lys Cys Arg Gly Asp Gly Ala Pro | |
| 100 105 110 | |
| ggt ggc cgc ccg gac ctg ctt att gct gtc aag tcg gtg gca gag gac | 384 |
| Gly Gly Arg Pro Asp Leu Leu Ile Ala Val Lys Ser Val Ala Glu Asp | |
| 115 120 125 | |

| | |
|---|------|
| ttc gag cgg cgc caa gcc gtg cgc cag acg tgg ggc gcg gag ggt cgc Phe Glu Arg Arg Gln Ala Val Arg Gln Thr Trp Gly Ala Glu Gly Arg 130 135 140 | 432 |
| gtg cag ggg gcg ctg gtg cgc cgc gtg ttc ttg ctg ggc gtg ccc agg Val Gln Gly Ala Leu Val Arg Arg Val Phe Leu Leu Gly Val Pro Arg 145 150 155 160 | 480 |
| ggc gca ggc tcg ggc ggg gcc gac gaa gtt ggg gag ggc gcg cga acc Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Asp Glu Val Gly Glu Gly Ala Arg Thr 165 170 175 | 528 |
| cac tgg cgc gcc ctg ctg cgg gcc gag agc ctt gcg tat gcg gac atc His Trp Arg Ala Leu Leu Arg Ala Glu Ser Leu Ala Tyr Ala Asp Ile 180 185 190 | 576 |
| ctg ctc tgg gcc ttc gac gac acc ttt ttt aac cta acg ctc aag gag Leu Leu Trp Ala Phe Asp Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu 195 200 205 | 624 |
| atc cac ttt cta gcc tgg gcc tca gct ttc tgc ccc gac gtg cgc ttc Ile His Phe Leu Ala Trp Ala Ser Ala Phe Cys Pro Asp Val Arg Phe 210 215 220 | 672 |
| gtt ttt aag ggc gac gca gat gtg ttc gtg aac gtg gga aat ctc ctg Val Phe Lys Gly Asp Ala Asp Val Phe Val Asn Val Gly Asn Leu Leu 225 230 235 240 | 720 |
| gag ttc ctg gcg ccg cgg gac ccg gcg caa gac ctg ctt gct ggt gac Glu Phe Leu Ala Pro Arg Asp Pro Ala Gln Asp Leu Leu Ala Gly Asp 245 250 255 | 768 |
| gta att gtg cat gcg cgg ccc atc cgc acg cgg gct agc aag tac tac Val Ile Val His Ala Arg Pro Ile Arg Thr Arg Ala Ser Lys Tyr Tyr 260 265 270 | 816 |
| atc ccc gag gcc gtg tac ggc ctg ccc gcc tat ccg gcc tac gcg ggc Ile Pro Glu Ala Val Tyr Gly Leu Pro Ala Tyr Pro Ala Tyr Ala Gly 275 280 285 | 864 |
| ggc ggt ggc ttt gtg ctt tcc ggg gcc acg ctg cac cgc ctg gct ggc Gly Gly Gly Phe Val Leu Ser Gly Ala Thr Leu His Arg Leu Ala Gly 290 295 300 | 912 |
| gcc tgt gcg cag gtc gag ctc ttc ccc atc gac gac gtc ttt ctg ggc Ala Cys Ala Gln Val Glu Leu Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly 305 310 315 320 | 960 |
| atg tgt ctg cag cgc ctg cgg ctc acg ccc gag cct cac cct gcc ttc Met Cys Leu Gln Arg Leu Arg Leu Thr Pro Glu Pro His Pro Ala Phe 325 330 335 | 1008 |
| cgc acc ttt ggc atc ccc cag cct tca gcc gcg ccg cat ttg agc acc Arg Thr Phe Gly Ile Pro Gln Pro Ser Ala Ala Pro His Leu Ser Thr 340 345 350 | 1056 |

ttc gac ccc tgc ttt tac cgt gag ctg gtt gta gtg cac ggg ctc tcg 1104
 Phe Asp Pro Cys Phe Tyr Arg Glu Leu Val Val Val His Gly Leu Ser
 355 360 365

gcc gct gac atc tgg ctt atg tgg cgc ctg ctg cac ggg ccg cat ggg 1152
 Ala Ala Asp Ile Trp Leu Met Trp Arg Leu Leu His Gly Pro His Gly
 370 375 380

cca gcc tgt gcg cat cca cag cct gtc gct gca ggc ccc ttc caa tgg 1200
 Pro Ala Cys Ala His Pro Gln Pro Val Ala Ala Gly Pro Phe Gln Trp
 385 390 395 400

gac tcc tag 1209
 Asp Ser

<210> 2
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Arg Arg Arg Leu Arg Leu Arg Arg Asp Ala Leu Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Ser Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ala Gln Arg Asp Gly Ala
 20 25 30
 Ala Pro Thr Ala Ser Ala Pro Arg Gly Arg Gly Arg Ala Ala Pro Arg
 35 40 45
 Pro Thr Pro Gly Pro Arg Ala Phe Gln Leu Pro Asp Ala Gly Ala Ala
 50 55 60
 Pro Pro Ala Tyr Glu Gly Asp Thr Pro Ala Pro Pro Thr Pro Thr Gly
 65 70 75 80
 Pro Phe Asp Phe Ala Arg Tyr Leu Arg Ala Lys Asp Gln Arg Arg Phe
 85 90 95
 Pro Leu Leu Ile Asn Gln Pro His Lys Cys Arg Gly Asp Gly Ala Pro
 100 105 110
 Gly Gly Arg Pro Asp Leu Leu Ile Ala Val Lys Ser Val Ala Glu Asp
 115 120 125
 Phe Glu Arg Arg Gln Ala Val Arg Gln Thr Trp Gly Ala Glu Gly Arg
 130 135 140
 Val Gln Gly Ala Leu Val Arg Arg Val Phe Leu Leu Gly Val Pro Arg
 145 150 155 160
 Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Asp Glu Val Gly Glu Gly Ala Arg Thr
 165 170 175
 His Trp Arg Ala Leu Leu Arg Ala Glu Ser Leu Ala Tyr Ala Asp Ile
 180 185 190
 Leu Leu Trp Ala Phe Asp Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu
 195 200 205
 Ile His Phe Leu Ala Trp Ala Ser Ala Phe Cys Pro Asp Val Arg Phe
 210 215 220
 Val Phe Lys Gly Asp Ala Asp Val Phe Val Asn Val Gly Asn Leu Leu
 225 230 235 240
 Glu Phe Leu Ala Pro Arg Asp Pro Ala Gln Asp Leu Leu Ala Gly Asp
 245 250 255
 Val Ile Val His Ala Arg Pro Ile Arg Thr Arg Ala Ser Lys Tyr Tyr
 260 265 270
 Ile Pro Glu Ala Val Tyr Gly Leu Pro Ala Tyr Pro Ala Tyr Ala Gly

275 280 285
 Gly Gly Gly Phe Val Leu Ser Gly Ala Thr Leu His Arg Leu Ala Gly
 290 295 300
 Ala Cys Ala Gln Val Glu Leu Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly
 305 310 315 320
 Met Cys Leu Gln Arg Leu Arg Leu Thr Pro Glu Pro His Pro Ala Phe
 325 330 335
 Arg Thr Phe Gly Ile Pro Gln Pro Ser Ala Ala Pro His Leu Ser Thr
 340 345 350
 Phe Asp Pro Cys Phe Tyr Arg Glu Leu Val Val Val His Gly Leu Ser
 355 360 365
 Ala Ala Asp Ile Trp Leu Met Trp Arg Leu Leu His Gly Pro His Gly
 370 375 380
 Pro Ala Cys Ala His Pro Gln Pro Val Ala Ala Gly Pro Phe Gln Trp
 385 390 395 400
 Asp Ser

<210> 3
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 3
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cttccagtta cccgacgcgg gtgcag 56

<210> 4
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 4
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctaggagtcc cattggaagg ggcct 55

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Ig kappa
 signal sequence

<400> 5
 Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly

20

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: FLAG peptide

<400> 6
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR

<400> 7
gcgacgcaga tgtgttcgt 19

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR

<400> 8
caattacgtc accagcaagc a 21

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: probe for RT-PCR

<400> 9
tgggaaatct cctggagt 18

<210> 10
<211> 1884
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| ttcaacctga | ccctcaagga | gatccacttc | ctcaagtggc | tggacatcta | ctgccccac | 60 |
| gtccccttca | ttttcaaagg | cgacgatgac | gtcttcgtca | accccaccaa | cctgctagaa | 120 |
| tttctggctg | accggcagcc | acaggaaaac | ctgttcgtgg | gcgatgtcct | gcagcacgct | 180 |
| cggccccattc | gcaggaaaaga | caacaaatac | tacatcccgg | gggcccgtga | cggcaaggcc | 240 |
| agctatccgc | cgtatgcagg | cggcgggtggc | ttcctcatgg | ccggcagcct | ggcccggcgc | 300 |
| ctgcaccatg | cctgcgacac | cctggagctc | tacccgatcg | acgacgtctt | tctgggcatg | 360 |
| tgcctggagg | tgcctggcgt | gcagcccacg | gcccacgagg | gcttcaagac | tttcggcatc | 420 |
| tcccggaaacc | gcaacagccg | gtttggccct | ggaagtggac | attcctctat | tactgtgaag | 480 |
| ttttatttat | gaagaatttg | gagggagaag | gctccaggct | tcaggagggg | gtgggtgtcct | 540 |
| ccctggccct | cctcccttcc | ctccctcat | tccagctgcc | tcccctcagc | accccacgc | 600 |
| ccctcacagc | ccagccccct | ccagagccct | gccccaccgc | accctgcttc | tccagggcct | 660 |
| agcagaccag | catctgcccc | ggtgaaggga | tggatcagct | gtgggggtgg | gtgcagaacg | 720 |
| ttgccacctc | ctacctcagc | gggagtcacc | taggaaagat | ggagggatig | acactatttt | 780 |
| ctcaataaaa | tgggactttt | tttttttttt | tttttttttt | tttttgggtg | gaaacttctt | 840 |
| gttcccagct | gcatcagaga | gcctgtctgg | ggccaagggt | gccagagatt | tctgaagaca | 900 |
| cagcttggtc | cttggtcttg | gctgggtggg | gcacaaggac | ttctggaagg | gatttagacg | 960 |
| gggctgagtg | ctaggattaa | agtggggatg | ggagtacggc | aacagaaaaa | cctgggagct | 1020 |
| agcaatgcac | ccagccccct | actgtgccct | ggtggacagc | cgagctgttg | ctctagcgtg | 1080 |
| agccagtggc | ttcctgtccc | tccaagggt | gagccagag | ttggccccga | ggctaattgt | 1140 |
| tcagtgggtg | agattaggtc | ggccgtacag | aggccggtgg | gctccctgac | atcccttcca | 1200 |
| ggcaacctga | aagcactgaa | atagcttatg | gccctgtgcc | agggaccttg | gccaagctg | 1260 |
| ctgacctcca | gggtggggag | ggagctaccc | ccaggagaag | agtcactcag | acagcagtat | 1320 |
| gagcaagcca | gccagcagct | ccgtgcctgc | accagctca | ggggaatccc | agggggttca | 1380 |
| gatgcccagg | aaggaaaagg | ggacagcgct | actgctatgg | aatgagacca | ccacttctcc | 1440 |
| tgttgtcctt | cccagcttct | ccccaacctc | cccttttccc | tagtttataa | gacaggagaa | 1500 |
| aaggagaaaa | gcaaaaagct | ggaaagaaac | agaagtaaga | taaatagcta | gacgaccttg | 1560 |
| gcgccaccac | ctggcccttg | tggttaaaat | gataataata | ttaacccttg | acaaaaacga | 1620 |
| ctggtgttat | ctgtaaatcc | cagacattgt | gtgagaaagc | accgtaaaac | ttttgtcct | 1680 |
| attagctgat | gtgtgtagcc | cccagtcacg | ttcctcacgc | ttacttgatc | tattatgacc | 1740 |
| ctttcacgtg | gaccccttag | agttgttaagc | tcttaaaagg | gctaggaatt | tctttttcgg | 1800 |
| ggagctcggc | tcttaagacg | cgagtctgcc | gacgctcccg | gccgaataaa | aacctcttcc | 1860 |
| ttctttaaaa | aaaaaaaaaa | aaaa | | | | 1884 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13957

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/15, C12N15/19, C12N15/21, C12N5/10,
C12N9/10, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/15, C12N15/19, C12N15/21, C12N5/10,
C12N9/10, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------------------|---|-----------------------------|
| <u>X</u> <u>A</u> | WO 00-53750 A1 (GENENTECH, INC.), 14 September, 2000 (14.09.00), & EP 1159422 A1 | <u>1-18</u> <u>19-24</u> |
| <u>X</u> <u>A</u> | Ken KATAOKA et al., A novel betal, 3-N-acetylglu cosaminyltransferase involved in invasion of canc er, cells as assayed in vitro., Biochem.Biophys. Res.Comm., 2002, Vol.294, pages 843 to 848 | <u>1,18</u> 2-17,19-24 |
| <u>X</u> <u>A</u> | Norihiko SHIRAISHI et al., Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-ac etylglucosaminyltransferases family., The Jour nal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, No.5, pages 3498 to 3507 | <u>1,18</u> 2-17,19-24 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 January, 2004 (29.01.04)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13957

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---------------|--|---------------------------|
| <u>X</u> A | Toshie IWAI et al., Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc: GalNAc-peptide beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans., The Journal of Biological Chemistry, 2002, Vol.277, No.15, pages 12802 to 12809 | <u>1,18</u> 2-17,19-24 |
| <u>X</u> A | Akira TOGAYACHI et al., Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc: lactosylceramide beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids., The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, No.25, pages 22032 to 22040 | <u>1,18</u> 2-17,19-24 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N15/15, C12N15/19, C12N15/21, C12N5/10, C12N9/10, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N15/15, C12N15/19, C12N15/21, C12N5/10, C12N9/10, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|-----------------------------|
| <u>X</u> A | WO 00/53750 A1(GENENTECH, INC.) 2000.09.14 & EP 1159422 A1 | <u>1-18</u> 19-24 |
| <u>X</u> A | Ken Kataoka et al., A novel betal, 3-N-acetylglucosaminyltransferase involved in invasion of cancer cells as assayed in vitro., Biochem Biophys Res Commun, 2002, Vol.294, p.843-848 | <u>1, 18</u> 2-17, 19-24 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.01.2004

国際調査報告の発送日

10.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎

4 B

3 2 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|-----------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| <u>X</u> A | Norihiko Shiraishi et al., Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases structurally related to the beta 1,3-galactosyltransferase family., The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, No.5, p.3498-3507 | <u>1, 18</u> 2-17, 19-24 |
| <u>X</u> A | Toshie Iwai et al., Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans., The Journal of Biological Chemistry, 2002, Vol.277, No.15, p.12802-12809 | <u>1, 18</u> 2-17, 19-24 |
| <u>X</u> A | Akira Togayachi et al., Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc:lactosylceramide beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids., The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, No.25, p.22032-22040 | <u>1, 18</u> 2-17, 19-24 |